

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

02091896 03290199

COPYRIGHT: 1991, JPO &amp; Japio

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

**03290199**

Get Exemplary Drawing

Access PDF of Official Patent. (Note: Cost incurred in a later step)

The Adobe Acrobat Reader must be installed on your computer to access Official Patent text.  
If you do not have this FREE reader, you can download it now from [www.adobe.com](http://www.adobe.com)

December 19, 1991

## MEASUREMENT OF ACID PHOSPHATASE ACTIVITY

**INVENTOR:** KUROIWA KATSUMASA; KATAYAMA KATSUHIRO; MIURA SHUNEI; NAGASAWA TAKESHI**APPL-NO:** 02091896**FILED-DATE:** April 6, 1990**ASSIGNEE-AT-ISSUE:** NITTO BOSEKI CO LTD**PUB-TYPE:** December 19, 1991 - Un-examined patent application (A)**PUB-COUNTRY:** Japan (JP)**IPC-MAIN-CL:** C 12Q001#42**CORE TERMS:** measurement, substrate, carrying, above-mentioned, phosphatase, phosphoric, monoester, alcohol, salt**ENGLISH-ABST:**

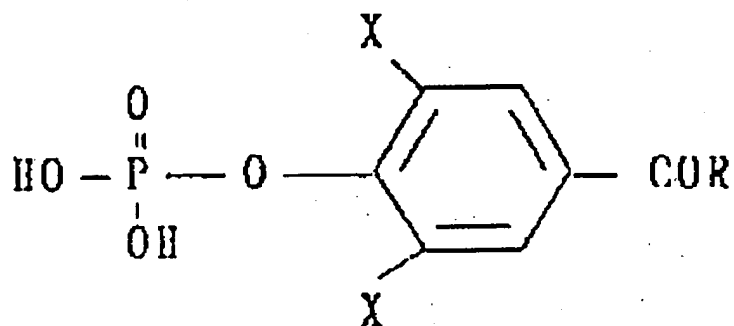
**PURPOSE:** To enable a high-sensitivity measurement and carrying out the subject measurement of phosphatase activity useful in the field of clinical analysis by using a specified phosphoric monoester or a salt thereof as a substrate and carrying out the above-mentioned measurement in the presence of a straight- chain alcohol.

**CONSTITUTION:** A phosphoric monoester of the formula [R is  $-(CH_2)_n$ , (n is 0-3); X is halogen] or a salt thereof is used as a substrate and one or more 3-6C straight chain alcohols (e.g. n-propanol) are added as an acid phosphatase activator to the reaction solution containing the above-mentioned substrate, thus carrying out the objective measurement of activity.

Source: [Legal > Area of Law - By Topic > Patent Law > Patents > Non-U.S. Patents > Patent Abstracts of Japan](#) Terms: **03290199** ([Edit Search](#))

View: Full

Date/Time: Thursday, December 11, 2003 - 10:21 AM EST



⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)12月19日

C 12 Q 1/42

6807-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 酸性ホスファターゼ活性測定法

⑯ 特 願 平2-91896

⑰ 出 願 平2(1990)4月6日

⑱ 発 明 者 黒 岩 勝 昌 福島県郡山市安積町荒井字下北井前1-44  
 ⑲ 発 明 者 片 山 勝 博 福島県郡山市富田町字大十内80-21  
 ⑲ 発 明 者 三 浦 俊 英 福島県郡山市富久山町久保田字大原198  
 ⑲ 発 明 者 長 澤 健 埼玉県浦和市領家7-19-10  
 ⑳ 出 願 人 日東紡績株式会社 福島県福島市郷野目字東1番地  
 ㉑ 代 理 人 弁理士 飯田 房雄

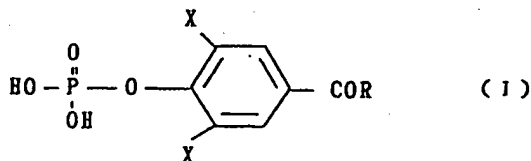
明 細 書

1. 発明の名称

酸性ホスファターゼ活性測定法

2. 特許請求の範囲

(1) 一般式(I)



〔式中、Rは-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、CH<sub>3</sub>、(n=0~3)、Xはハロゲン原子を表す。〕で表されるホスホモノエステルまたはその塩を基質として用い、かつ3~6個の炭素原子を含有する少なくとも1種の直鎖状アルコールを、酸性ホスファターゼ活性化剤として反応液中に基質と共存させることを特徴

とする酸性ホスファターゼ活性測定法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、酸性ホスファターゼ活性測定法に関する。本発明によれば酸性ホスファターゼ活性の高感度測定が可能であり、臨床検査用測定法として医学的治療や臨床検査の分野において極めて有用である。

〔従来技術〕

酸性ホスファターゼ(以下Acpと記す)は、酸性条件下(pH4~6)において、リン酸モノエステルを加水分解する酵素で、前立腺癌、骨転移をもつ乳癌や骨疾患、肝及び腎疾患患者で血清、血漿または尿中のAcp活性の上昇が見られ、特に前立腺癌において著しく上昇することから、Acp活性は腫瘍マーカーとして極めて重要とされている。

これまでにAcp活性を、基質としてフェニルリ

ン酸、p-ニトロフェニルリン酸、β-グリセロリン酸、プロパンジオールリン酸、チモールフタレインリン酸、フェノールフタレインリン酸、アデノシンモノリン酸、ナフチルリン酸、2-クロロ-4-ニトロフェニルリン酸、2,6-ジクロロ-4-ニトロフェニルリン酸を用いて測定する方法が報告されている。しかし、これらの基質には以下に示すように種々の問題点があり、測定上の不便さ、あるいは測定値の不正確さを有するため、日常の臨床検査に実用化されたものでも信頼度は低い。

基質としてフェニルリン酸、p-ニトロフェニルリン酸、β-グリセロリン酸、プロパンジオールリン酸、チモールフタレインリン酸、フェノールフタレインリン酸、アデノシンモノリン酸を用いた場合は、反応に長時間を要する、あるいは停止呈色反応を必要とするため初速度分析ができず、自動分析装置への適応も不可能である。また基質として、ナフチルリン酸、2-クロロ-4-ニトロフ

- 3 -

Xはハロゲン原子を表す。]で表されるホスホモノエステルまたはその塩を基質として用いた場合、初速度分析が可能であり、かつヘモグロビンやビリルビンの影響を受けにくい紫外領域に測定波長を有するため、自動分析装置を用いて極めて正確で再現性の良いAcp活性の測定が可能である(特願平1-128431)。

しかし、一般に血清、血漿、または尿など生体試料中のAcp活性は、それ自体が比較的低いため一般式(I)で表されるホスホモノエステルまたはその塩を基質に用いて測定しても、それだけで高い測定感度を得ることは困難である。

[発明が解決しようとする課題]

本発明の目的は、一般式(I)で表されるホスホモノエステルまたはその塩を基質を用いて感度の高いAcp活性の測定を可能とすることである。

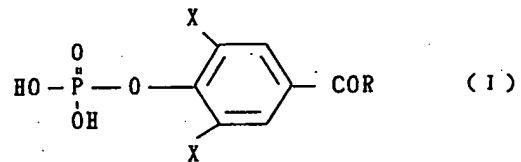
[問題点を解決するための手段]

本発明者らは、Acp活性測定の際に一般式(I)

- 5 -

フェニルリン酸、2,6-ジクロロ-4-ニトロフェニルリン酸を用いた場合は、反応までに大きなラグタイムがあり、測定値に大きな誤差が発生することが避けられない、あるいは分光分析の測定波長が400nm近傍であるため、やはりその波長域に高い吸光を示す血清中のヘモグロビンやビリルビンの影響を受けやすい。

一方、生体試料中の酸性ホスファターゼ活性を測定する際、本発明者らの先願発明に係る一般式(I)

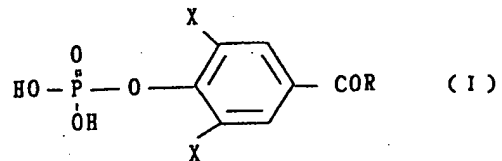


[式中、Rは-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、CH<sub>3</sub>、(n=0~3)、

- 4 -

で表される基質と種々のアルコールの添加を組み合わせることを検討した結果、より高感度の測定が可能なることを見出だした。本発明は、この知見に基づいてなされたものである。

すなわち本発明は、一般式(I)



[式中、Rは-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、CH<sub>3</sub>、(n=0~3)、Xはハロゲン原子を表す。]で表されるホスホモノエステルまたはその塩を基質として用い、かつ3~6個の炭素原子を含有する少なくとも1種の直鎖状アルコールを、酸性ホスファターゼ活性化剤として反応液中に基質と共存させることを特徴

- 6 -

とする酸性ホスファターゼ活性の高感度測定法である。

上記式(1)のRは、メチル、エチル、プロピルまたはブチルである。Xは、例えば塩素、臭素、フッ素などのハロゲン原子である。上記式(1)のホスホモノエステルの塩を基質として用いる場合、その塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩、シクロヘキシルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩などのアミン塩等が挙げられる。

Acp測定の際に基質として用いるときの濃度は50 $\mu$ M $\sim$ 5mMの範囲であり、前立腺由来酸性ホスファターゼに対するKm値が0.14mMであることから好ましくは1mM $\sim$ 2mMである。

基質に共存させるAcp活性化剤のアルコールは、3 $\sim$ 6個の炭素原子を有する直鎖状アルコールであり、好ましくはn-プロパノール、n-ブタノール、

- 7 -

例えばBrij-35、トリトンX-100のような界面活性剤、あるいはマグネシウムイオンのような安定化剤を加えることも可能である。

本発明の方法によるAcp活性の測定は、通常次のように実施する。まず、適当な活性化剤であるアルコールを含む緩衝液に測定すべき生体試料を混合し、その溶液を20 $^{\circ}$ C $\sim$ 40 $^{\circ}$ Cで2分間 $\sim$ 10分間、好ましくは30 $^{\circ}$ C $\sim$ 37 $^{\circ}$ Cで3分間 $\sim$ 5分間インキュベートする。次に、その混合液に一般式(1)で表されるホスホモノエステル又はその塩を基質として含む液を加えて急速に攪拌し、そこで起こるAcpによる基質分解反応を分光光度計にて300nm $\sim$ 370nm、好ましくは330nm $\sim$ 340nmの波長における吸光度変化として測定し、それをもとに1分間当りの吸光度の増加を求めることにより活性を測定する。

#### [実施例]

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明

- 9 -

n-ペンタノール、n-ヘキサノール、1,4-ブタンジオール、1,2-ペンタンジオール、1,5-ペンタンジオール、1,2-ヘキサンジオール、特に好ましくは、1,4-ブタンジオールまたは1,5-ペンタンジオールである。これらのアルコールは、測定の際単独で用いても数種類組み合わせ用いても構わない。

本発明で用いるアルコールの反応液中での濃度は、一般に10 $\mu$ M $\sim$ 2000 $\mu$ Mであり、好ましくは100 $\mu$ M $\sim$ 1000 $\mu$ Mである。

反応時のpHは4.0 $\sim$ 6.5、好ましくは5.0 $\sim$ 6.0に設定する。pHをその範囲で一定に保つための緩衝剤として、クエン酸、酢酸、コハク酸、フタル酸およびその塩などが使用できる。それら以外の緩衝剤でもpH4.0 $\sim$ 6.5の範囲で緩衝能を維持できるものであれば用いることが可能である。緩衝剤の濃度は一般的に50 $\mu$ M $\sim$ 300 $\mu$ M、好ましくは50 $\mu$ M $\sim$ 100 $\mu$ Mに設定する。

また、反応液には診断目的に好適な添加剤、例

- 8 -

するが、本発明はこれによって限定されるものではない。

#### 実施例1

基質として2,6-ジクロロ-4-アセチルフェニルリン酸、活性化剤として1,5-ペンタンジオールを用いてヒト前立腺由来の酸性ホスファターゼの活性を測定した。基質の合成は特願平1-128431記載の方法によった。以下に測定の概要を示す。

0.1%トリトンX-100および種々の濃度の1,5-ペンタンジオールを含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH5.4)2mlに試料のヒト前立腺由来酸性ホスファターゼ(シグマ社製)0.1mlを加え、37 $^{\circ}$ Cで3分間インキュベートする。これに、0.01Mクエン酸緩衝液(pH3.0)に2,6-ジクロロ-4-アセチルフェニルリン酸を6 $\mu$ Mとなるように溶解して得た基質液を0.5ml加えて反応を開始させ、分光光度計(日立220A型)にて340nmでの吸光度変化を測定し、1分間当りの吸光度変化を求めた。

- 10 -

その測定結果を、1,5-ペンタンジオールが無添加の場合の活性値と共に第1表に示す。

第1表

1,5-ペンタン ジオール濃度 (mM:反応液中)	Acp 活性 ( $\Delta E/\text{min}$ )	相対活性 (%)
0	0.0867	100
50	0.1107	128
100	0.1245	144
200	0.1316	152
250	0.1326	153
300	0.1317	152

## 実施例 2

1,5-ペンタンジオールを1-プロパノール、1-ブタノール、1,4-ブタンジオール、1,2-ペンタンジオール、1,2-ヘキサジオール、プロピレングリコールに代えて、実施例1と同様の操作で測定を

- 11 -

モノエステルまたはその塩について極めて高感度のAcp活性測定を提供し、これをもって日常の臨床検査の実施に貢献するものである。

特許出願人

日東紡績株式会社

代理人 飯田 房 雄

行った。

測定結果を第2表に示す。

第2表

アルコール	反応液中の濃度 (mM)	相対活性 (%)
無添加	0	100
1-プロパノール	400	118
1-ブタノール	400	136
1,4-ブタンジオール	667	143
1,2-ペンタンジオール	267	139
1,2-ヘキサジオール	133	135
プロピレングリコール	667	120

## [発明の効果]

本発明の方法によりAcp活性を測定すると、実施例に示す通り対照値と比較して相対活性は著しく向上する。したがって本発明は、種々の長所を有する基質である一般式(I)で表されるホスホ

- 12 -